

⑨日本国特許庁

⑩特許出願公開

公開特許公報

昭52-154595

⑪Int. Cl.
C 12 D 13/00識別記号
145⑫日本分類
36(2) D 531.42序内整理番号
7048-49

⑬公開 昭和52年(1977)12月22日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭発酵法によるイノシンの製造法

⑮特 願 昭51-70518
 ⑯出 願 昭51(1976)6月16日
 ⑰発明者 江井仁
 ⑱ 同 退子市池子2-30-2
 松井裕
 川崎市幸区鹿島田958

⑩発明者 佐藤勝明

同 横須賀市馬堀海岸1-1
 滝波弘一
 横浜市港北区篠原台町3-16-10

⑪出願人 味の素株式会社
 東京都中央区京橋1丁目6番地

明細書

1 発明の名称 発酵法によるイノシンの製造法
 2 審査請求の範囲

パテルス菌に属し、アデニンを要求し、粗株に比べより強いG-スタレオテーゼ(5135)活性を有し、かつイノシン生産能を有する変異株を培養し、培地中に生成蓄積したイノシンを採取することを特徴とする発酵法によるイノシンの製造法。

3 発明の詳細な説明

この発明は発酵法によるイノシンの製造法に関する。

従来イノシンはパテルス菌の変異株を用いて製造されている。本発明者らに従来の製造法を更に改良すべく検討した結果、従来のパテルス菌のイノシン生産能を有する変異株に、更に剛性よりより強いG-スタレオテーゼ(5135)活性を付与したような変異株が、より高い収率でイノシンを生産することを知つた。

即ち、この発明は、パテルス菌に属し、アデニンを要求し、粗株に比べより強いG-スタレオテーゼ活性を有し、かつイノシン生産能を有する変異株を培養し、培地中に生成蓄積したイノシンを採取することを特徴とする発酵法によるイノシンの製造法である。

本発明の方法において用いる微生物は上記のような性質を有するものであるが、このような微生物は通常の方法により純度より更に高め得る。G-スタレオテーゼ活性の強い変異株のスクリーニングは、G-スタレオテーゼを基質として、培養の初期段階で高い吸光度を測定することにより容易になし得る。

また本発明の変異株に、更に従来イノシン生成を増加することが知られている性質、例えばアミノ酸要求性、ブリンアナロゲ物性、G-ターアニル酸レダクターゼ欠損等性質を更に付与すればより生産能の高い変異株が得られる。

本発明の変異株を構築する際に用いる粗株としては従来イノシンを生産することが知られて

いる、パチルス・ズブナリス、パチルス・ブキルス、パチルス・リクエフォルミス等があげられる。

次にこのような微生物を使用開発した具体的な一例を示す。

実験例

パチルス・ズブナリス AJ 11045 (FERM-P 3589) をヌーメアル-リードトローリー-ニトロソグアミジン (1000r/m) にて0.07で40分間処理し、ついで紫外線を1分間照射した。これで、下記培地に培育し、生じたコロニーを0.07のリードトロフエニルリン酸鈷液を濃縮し、黄色ペーローを大きく生じた菌株を採取した。このようにして得られたアルカリホスファターゼ活性の高い菌株の中からさらに5'-AMPを基質として核酸合成の初期速度を測定し(ヘンペルらの方法)、5'-ヌクレオチダーゼ活性を測定した。かくして、イノシン生産能の高い AJ 11045 (FERM-P 3587) を得た。

上記と同様な方法により AJ 11046 (FERM-P

特開昭52-154593/例
株 AJ 11044 (FERM-P 3588) を得た。

培地:

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	3.7/g
MgO	3.9/g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g/g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.015 g/g
グルコース	2 g/g
ペプトン	2 g/g
アデニン	0.1 g/g

(pH 8.0)

かくして開発された本発明の或異株の5'-ヌクレオチダーゼの粗体に対する比活性は第1図に示す通りである。

第 1 図

菌 株	性 質	5'-ヌクレオチダーゼの比活性
パチルス・ズブナリス		0.04
AJ 11045(FERM-P 3589)	Ade ⁻ AdE ⁻ 5'-OMP-レダクターゼ欠損	1.00
AJ 11045(FERM-P 3587)	Ade ⁻ AdE ⁻ 5'-OMP-レダクターゼ欠損, 5'-ヌクレオチダーゼ強	5.50
AJ 11046(FERM-P 3590)	Ade ⁻ AdE ⁻ 5'-OMP-レダクターゼ欠損, 5'-アザグアニン耐性	1.00
AJ 11044(FERM-P 3588)	AdE ⁻ AdE ⁻ 5'-OMP-レダクターゼ欠損, 5'-アザグアニン耐性, 5'-ヌクレオチダーゼ強	5.50

微生物の培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン、アデニンをよりその他に被要求物質、その他必要に応じ適当な有機被要求物質を含有する通常の培地である。

炭素源としては、グルコース、シルクロース等の炭水化物、エタノール、グリセリン、ソルビトール等のアルコール、酢酸等の有機酸が適

宜使用できる。窒素源としてはアンモニア水、アンモニア水、アンモニアガス等が用いられる。

培養の条件としては、好気的条件がよく、培養温度は25℃~40℃、培養日数は通常2~5日である。場合によつては培養途中で培養温度を若干変化させる事もよい。培養開始時より培養中のpHは5.0~8.0がよくpHの調整は無機酸或は有機酸はアルカリ性物質、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水、尿素などを使用することができる。

培養液よりイノシンを採取するには、粗体を分離除去し、その上清をイオン交換樹脂処理したのち、イノシン区分をを集め濃縮し有機溶媒を加える。この操作で折出するイノシンを水又は有機溶媒(80% EtOH)から再結する。この操作にて得られた精製結晶は元素分析、リガースの呈色、紫外線吸収曲線、赤外線吸収曲線より純品のアノノシンと一致した。

実験例 1

シード培地

グルコース

6 g/dl

KCL

特開昭52-154595(3)

2.1 g/dl

NH₄Cl

0.5 g/dl

リボ核酸

0.1 g/dl

KH₂PO₄

0.05 g/dl

キサンチン

5 mg/dl

MgSO₄·7H₂O

0.04 g/dl

DL-α-チオニン

0.05 g/dl

大豆蛋白加水分解液

4 ml/dl

大豆蛋白加水分解液

3.2 ml/dl

チオ核酸

0.6 g/dl

CaCO₃ (別容器)

2 g/dl

キサンチン

4 ml/dl

pH

7.0 (KOH)

pH 2.4

(KOH)

上記シード培地 50 ml を 500 ml 容器に移入

スコ代を詰込み、第 2 段に示す微生物を用意して

54 °C にて 16 時間振盪培養した。

一方上記発酵培地 20 ml を 500 ml 容器に移入

スコ代を入れ、上記振盪液 1 ml を接種し、

34 °C にて 72 時間振盪培養した。

培養液中のイノシンをペーパークロマトグラ

フ法により分離した後、0.1 M HCl で抽出し、

280 nm の吸光度を測定したところ 2.0% の

イノシンが生成確認した。

上記と同様な方法により AJ 11044 の培養液

1 ml を接種し、固体を除去したの後液を常法に

実験用培地

グルコース

6 g/dl

NH₄Cl

1.5 g/dl

KH₂PO₄

0.05 g/dl

MgSO₄·7H₂O

0.04 g/dl

FeSO₄·7H₂O

1 mg/dl

MnSO₄·4H₂O

1 mg/dl

ヨウ素イオン交換樹脂にて処理した後、イノシン
区分を捉め連続した。粗イノシン結晶を得て再
結晶、精製し、結晶 1.2 g を得た。

固形	イノシン	
	溶剂量 ml	純度 %
バチルス・エブチリス		
AJ 11045 (FERM-P 5569)	1.5	
AJ 11048 (FERM-P 5587)	1.9	
AJ 11046 (FERM-P 5590)	1.4	
AJ 11044 (FERM-P 5586)	2.0	

特許出願人 次の会社株式会社